

APPLICATION
FOR
UNITED STATES LETTERS PATENT

TITLE: COMPOUNDS CAPABLE OF MODULATING THE
ACTIVITY AND STIMULATING THE PRODUCTION OF A
CATALYTIC ANTIBODY

APPLICANT: ALAIN FRIBOULET, BERANGERE AVALLE-BIHAN,
HELENE DEBAT AND DANIEL THOMAS

CERTIFICATE OF MAILING BY EXPRESS MAIL

Express Mail Label No. EV 331654195 US

November 17, 2003
Date of Deposit

COMPOSES CAPABLES DE MODULER L'ACTIVITE ET DE STIMULER LA PRODUCTION D'UN ANTICORPS CATALYTIQUE

L'invention a trait à des nouveaux composés capables de moduler l'activité et de stimuler la production des anticorps catalytiques. L'invention porte en particulier sur un composé capable d'augmenter l'activité d'un anticorps catalytique caractérisé en ce qu'il a une affinité spécifique pour le site catalytique dudit anticorps, et en ce qu'il n'est pas immunogène. De tels composés sont utiles en particulier pour le traitement thérapeutique ou la prévention d'une pathologie liée à une déficience enzymatique, pour stimuler *in vivo* l'hydrolyse de xénobiotiques, de drogues, de médicaments ou toute autre molécule potentiellement toxique pour l'organisme ou encore pour prévenir ou empêcher des réactions allergiques.

Anticorps et enzymes ont en commun la propriété de reconnaître spécifiquement des molécules. A l'exception des cas pathologiques, l'anticorps reconnaît un antigène ou une molécule qui est étrangère à l'organisme produisant l'anticorps. La liaison de l'anticorps à l'antigène conduit généralement à la neutralisation de la molécule étrangère à l'organisme. Les enzymes sont des catalyseurs biologiques qui se lient à une molécule de telle sorte que l'énergie d'activation d'une réaction impliquant la molécule est abaissée, augmentant ainsi la vitesse de la réaction.

En 1946, Linus Pauling proposa le concept suivant: Les anticorps lieraient de façon préférentielle les états stables des molécules tandis que les enzymes lieraient de façon préférentielle l'état de transition d'état énergétique plus élevé plutôt que la molécule de substrat dans son état de basse énergie. Selon l'hypothèse de Pauling (Pauling, L., *Nature* (1948) 161 :707), l'enzyme stabiliserait l'état de transition des molécules, réduisant

l'énergie d'activation d'une réaction et augmentant ainsi la vitesse de cette réaction.

En poursuivant cette hypothèse, il a été proposé une stratégie pour l'obtention de nouvelles activités catalytiques, basée sur la production d'anticorps dirigés contre un haptène qui mime l'état de transition d'une réaction donnée, encore appelé « Analogue d'Etat de Transition » ou TSA (Transition State Analogue). Ainsi, un anticorps dirigé contre de tels antigènes devrait acquérir des propriétés catalytiques similaires à celles des enzymes.

Cette stratégie fut confirmée de nombreuses fois depuis 1986. Des anticorps catalytiques peuvent en effet être induits par l'immunisation d'un animal avec un analogue d'état de transition (TSA) rendu immunogène (Pollack *et al.*, *J Am Chem Soc* (1988) 110 : 8713, Jackson *et al.*, *PNAS* (1988) 85 : 4953, Shokat *et al.*, *Chem Int Ed Engl* (1988) 27 : 1172) et sont capables de catalyser différents types de réaction chimique. Depuis les premiers résultats démontrant la possibilité d'induire la production d'anticorps catalysant des réactions d'hydrolyse d'esters et de carbonates, plus de 70 réactions différentes ont pu être catalysées par des anticorps. Ces réactions concernent aussi bien l'hydrolyse de liaisons chimiques (esters, amides, additions de Diels-Alder,...) que des réactions d'isomérisation, de décarboxylation, d'oxydo-réduction, etc...

En parallèle, des anticorps possédant une activité catalytique ont pu être isolés à partir du sérum de malades atteints de différentes pathologies. Les premières démonstrations ont été réalisées en purifiant les anticorps à partir de sérums humains. Ces anticorps catalytiques « naturels » ont notamment des activités DNase ou protéase. En particulier, des anticorps catalytiques présentant une activité protéase contre le peptide vasoactif intestinal (VIP) furent ainsi isolés du sérum de patients atteints d'asthme. Ces mêmes anticorps ont pu être obtenus par l'immunisation de souris

avec le même peptide immunogène (Paul *et al.*, *J Neuroimmunol* (1989) 23 : 133-142). D'autres activités protéases ont été extraites, qui clivent la thyroglobuline chez des patients atteints de la Thyroïdite d'Hashimoto ou le facteur VIII chez des hémophiles traités par ce facteur de coagulation (INSERM, Bayer Pharma, 1999, EP 1074842). Une activité catalytique d'hydrolyse de l'ADN a été montrée dans le sérum de patients atteints de lupus érythémateux ou d'arthrite rhumatoïde (Shuster A.M. *et al.*, *Science* (1992) 256 : 665-667). Il semble que cette activité DNase soit corrélée aux symptômes de ces pathologies.

Il a récemment été proposé une autre voie pour la production d'anticorps catalytiques fondée sur la préparation d'anticorps anti-idiotypiques mimant le site catalytique d'une enzyme. Par exemple, il a été montré qu'il est possible d'induire *in vivo* la production d'anticorps catalytique anti-idiotypique à activité β -lactamase par immunisation avec un anticorps dirigé contre le site actif de la β -lactamase (Avalle B. *et al.*, *Faseb J.*, (1998) 12 :1055-1060).

Les applications des anticorps catalytiques sont multiples. En particulier, de tels anticorps catalytiques seraient utiles pour la catalyse de réactions chimiques qui ne sont pas réalisées par les enzymes naturelles, notamment pour agir *in vivo* sur le métabolisme (application médicale) ou réaliser des réactions chimiques particulières (application industrielle).

Compte tenu du vaste répertoire de spécificité des anticorps et aussi de leurs implications dans les processus d'immunité acquise, d'allergies et d'auto-immunité, on comprend l'intérêt de produire *in vivo* des anticorps catalytiques, notamment pour leurs applications thérapeutiques.

Une des applications qui a été développée concerne l'utilisation des propriétés hydrolytiques des anticorps catalytiques pour activer des composés non toxiques en composés cytotoxiques (Zen ca Ltd, 1998, US

5,807,688). En ciblant cette activité au niveau de cellules cibles, des molécules dont la cytotoxicité est masquée par un groupement chimique pourraient être activées au contact de cellules tumorales pour des traitements anti-cancéreux (méthode ADAPT, Antibody-directed Abzyme Prodrug Therapy). Un autre exemple concerne la capacité de certains anticorps à hydrolyser la cocaïne. Le développement d'un anticorps ayant ces propriétés pourrait permettre son utilisation dans le traitement d'overdoses et d'addiction à la cocaïne. Le brevet décrit une méthode d'induction de la stimulation d'anticorps catalytique à l'aide de l'immunisation d'un mammifère avec un haptène, analogue d'états de transition (Barber *et al.*, 2000, US 6,017,541). Un troisième exemple est développé par Advanced Biotech qui produit des anticorps catalytiques pour le traitement des infections par des bactéries gram-négatives en visant l'endotoxine (Genetic Engineering News (1999) vol. 19 n° 20 page 15).

Théoriquement, les recherches visant à produire des anticorps capables d'hydrolyser une molécule spécifique et en particulier un polypeptide pourraient déboucher sur la conception de nouveaux traitements thérapeutiques, notamment de traitements d'un déficit enzymatique particulier, de traitements anti-viraux, de traitements des xénobiotiques potentiellement toxiques pour l'organisme ou encore de méthodes de prévention des allergies.

Cependant, pour être efficaces dans de telles applications, les activités catalytiques de ces anticorps doivent être suffisamment significatives au regard de l'effet recherché.

Des méthodes basées sur la conception des haptènes susceptibles d'induire la production *in vivo* d'anticorps catalytiques (Igen International Inc., 1989, EP 0 413 762), les stratégies d'immunisation (Boston Biomedical Research Institute, 2000, US 6,140,091), la modification site-

dirigée d'anticorps ou les méthodes de criblage (catELISA, Tawfik *et al.*, *PNAS* (1993) **90** : 373-377) et de sélection (phage-display) (Smith *et al.*, 1999, US 5,855,885) ont permis d'améliorer de façon significative les propriétés catalytiques de certains anticorps et/ou leur production *in vivo*.

5 Cependant, ces méthodes s'appliquent au cas par cas et s'avèrent insuffisantes dans de nombreux cas pour obtenir une efficacité compatible avec une utilisation médicale ou industrielle. Il existe donc toujours un besoin d'identifier de nouvelles méthodes permettant d'améliorer les propriétés catalytiques des anticorps catalytiques ou d'induire de nouvelles
10 activités catalytiques.

Il a été montré récemment que les substrats des anticorps catalytiques peuvent former *in vitro* un complexe d'interaction stéréospécifique différent du complexe antigène-anticorps et induire une modification de la conformation des anticorps, ladite modification augmentant l'affinité de
15 l'anticorps catalytique pour son substrat (Lindner *et al.*, *J Mol Biol* (1999) **285** : 421-430). En particulier, l'analyse des anticorps anti-idiotypiques a permis de montrer que le site catalytique cohabite dans l'espace contenant la zone de reconnaissance de l'immunogène sans se confondre avec elle. Il a en outre été montré qu'il est possible de garder la fonction immunitaire et
20 perdre la fonction catalytique d'un anticorps (Kolesnikov *et al.*, *PNAS* (2000) **97** : 13526-13531), suggérant ainsi que la zone fonctionnelle de l'anticorps catalytique réalise deux fonctions nettement différenciées (réponse immunitaire spécifique ou catalyse) et qu'il existe au niveau de cette zone, une compétition pour complexer des molécules potentiellement
25 différentes (antigène ou substrat).

L'invention résulte de la découverte qu'il est possible de moduler *in vivo* l'activité d'un anticorps catalytique à l'aide d'un composé non immunogène et présentant une affinité spécifique pour le site catalytique dudit anticorps. De tels composés ont un effet direct sur l'activité catalytique n induisant

un changement conformationnel des anticorps déjà produits. De plus, de façon particulièrement surprenante, les inventeurs ont constaté que, en dépit du caractère non immunogène de ces composés, ceux-ci pourraient augmenter indirectement la production des anticorps catalytiques, en déplaçant l'équilibre du système immunitaire vers une production d'anticorps à activité catalytique augmentée, ce déplacement étant induit par le changement conformationnel des anticorps pré-existants.

Ainsi, l'invention porte sur un composé capable de moduler l'activité d'un anticorps catalytique, ledit composé étant caractérisé en ce qu'il a une affinité spécifique pour le site catalytique dudit anticorps, et en ce qu'il n'est pas immunogène.

Elle porte également sur un procédé de modulation de l'activité d'un anticorps catalytique comprenant la mise en contact dudit anticorps avec un composé non immunogène et ayant une affinité spécifique pour le site catalytique dudit anticorps.

Un anticorps catalytique est un anticorps capable de reconnaître de manière spécifique mais non exclusive, deux types de molécules :

- l'antigène ou immunogène, c'est à dire une molécule susceptible d'induire une réponse immunitaire directe par l'activation des lymphocytes B ou T spécifiques selon la nature de l'antigène, et,
- le substrat, qui reconnaît spécifiquement le site catalytique de l'anticorps et, comme son nom l'indique, est le substrat de la réaction chimique catalysée par l'anticorps catalytique.

Par « composé non immunogène », il faut comprendre un composé incapable d'activer directement des lymphocytes B ou T spécifiques (sélection clonale). Bien entendu, il faut garder à l'esprit que de tels composés non immunogènes sont cependant capables d'augmenter *in vivo* la production d'anticorps catalytiques de manière indirecte lorsqu'ils ont une

affinité spécifique pour le site catalytique de l'anticorps, par le mécanisme décrit ci-dessous :

Les anticorps catalytiques peuvent se présenter sous deux isoformes : une isoforme dite « non active » ou « peu active » (ci-après nommé Ab), et une
5 isoforme dite « active » (ci-après nommé Ab*). L'isoforme active (Ab*) présente une activité catalytique (ci-après nommé k_{cat}^*) supérieure à celle de l'isoforme non active (ci-après nommé k_{cat}). En présence d'un composé (S) selon l'invention, la fixation dudit composé à l'anticorps catalytique pour former le complexe (Ab.S) déplace l'équilibre vers la formation du complexe
10 (Ab*.S), phénomène qui s'apparente au comportement allostérique illustré à la figure 1. Le changement de conformation induit par le composé selon l'invention conduit ainsi à la modulation *in vivo* de l'activité catalytique de l'anticorps qui passe d'une valeur k_{cat} à une valeur k_{cat}^* , la valeur k_{cat}^* étant différente de la valeur k_{cat} .

15 Une modulation de l'activité catalytique peut ainsi être obtenue sur des anticorps catalytiques présents dans le sérum de patients par l'injection sous forme de pulse des composés selon l'invention, selon des méthodes analogues à celles mises en œuvre pour un vaccin.

20 De préférence, un composé selon l'invention est capable d'augmenter l'activité d'un anticorps catalytique.

Le changement conformationnel de l'isoforme Ab vers l'isoforme Ab* peut aussi conduire *in vivo* à une stimulation indirecte de la production de nouveaux anticorps. Ainsi, dans un mode de réalisation préféré de l'invention, un composé selon l'invention tel que défini plus haut est capable
25 de stimuler la production de l'anticorps catalytique dont il augmente l'activité.

Par stimulation de la production, il faut bien comprendre qu'il ne s'agit pas d'une production *de novo* de l'anticorps mais d'une augmentation de la

production d'anticorps préexistant, par exemple suite à une première immunisation avec un antigène.

Selon les applications recherchées d'un composé de l'invention, celui-ci est avantageusement choisi dans un groupe comprenant :

- 5 - un substrat d'une enzyme ou l'un de ses analogues, inhibiteur ou activateur ;
- un ligand se fixant sur un récepteur et notamment une hormone, une drogue, un médicament ou l'un des ses fragments ou analogues ;
- un antibiotique ou l'un de ses analogues ;
- 10 - un polypeptide viral, bactérien ou parasitaire ;
- un xénobiotique récalcitrant et potentiellement toxique ; ou,
- un analogue d'allergène.

15 Par analogue de substrat d'enzyme, il faut comprendre les substrats non immunogènes d'une enzyme et molécules dérivées, et en particulier les analogues stables d'états de transition non immunogènes d'une enzyme ou des inhibiteurs ou activateurs non immunogènes de cette enzyme. Les analogues de substrat d'enzyme selon l'invention peuvent être notamment des fragments d'anticorps reconnaissant spécifiquement le site catalytique d'une enzyme.

20 De tels composés sont capables d'augmenter *in vivo* l'activité catalytique et/ou la production des anticorps catalytiques pour lesquels ils présentent une affinité et peuvent ainsi compenser une activité enzymatique déficiente ou réduite suite à une pathologie ou à un traitement thérapeutique, par exemple.

25 Les activités enzymatiques déficientes ou réduites suite à une pathologie ou à un traitement thérapeutique peuvent être par exemple des activités de type hydrolase et en particulier des activités peptidase, protéase, des

activités de type oxydoréductase (par exemple déshydrogénase, oxydase ou oxygénase), des activités isomérases, des activités lyases et en particulier décarboxylase, des activités transférase et en particulier des activités kinase, ou encore des activités ligase.

5 A titre d'exemples de pathologies, on peut citer :

- l'anémie hémolytique chronique qui est la conséquence d'un déficit en triose phosphage isomérase,
- la leucémiose qui est la conséquence d'un déficit en céto-acide décarboxylase,
- 10 • le syndrome de Lesch-Nyhan qui est la conséquence d'un déficit en hypoxanthine guanine phosphoribosyl-transférase,
- l'acidurée glutarique type II qui est la conséquence d'un déficit en acétyl-CoA déshydrogénase, ou encore
- 15 • l'hyperglycérémie qui est la conséquence d'un déficit en glycérol kinase.

Il est important de souligner à ce stade que, de manière surprenante, un composé selon l'invention, inhibiteur d'une enzyme est capable d'augmenter l'activité catalytique d'un anticorps catalytique mimant l'activité de cette enzyme, *via* ses propriétés spécifiques vis-à-vis des anticorps catalytiques, décrites ci-dessus, en dépit de ses propriétés inhibitrices.

Un substrat d'enzyme ou analogue entrant dans la définition des composés selon l'invention peut donc être par exemple, selon la nature de l'enzyme dont il est le substrat, un peptide, mais aussi un sucre ou l'un des ses dérivés, un lipide ou l'un de ses dérivés, un nucléotide ou l'un de ses dérivés ou encore un stéroïde ou l'un de ses dérivés.

Un exemple d'un tel analogue de substrat d'enzyme est un inhibiteur non immunogène de l'activité β -lactamase, dont l'injection sous forme oral peut induire la production d'anticorps hydrolysant les antibiotiques à noyau

β -lactame. Ainsi un composé selon l'invention est en particulier un peptide ayant une affinité pour le site actif de la β -lactamase, et de manière encore préférée, caractérisé en ce qu'il inhibe spécifiquement l'activité β -lactamase.

5 L'invention a trait aussi à un composé apte à augmenter *in vivo* le niveau physiologique d'une activité enzymatique, caractérisé en ce qu'il comprend un substrat non immunogène d'un anticorps catalytique ayant ladite activité enzymatique ou l'un de ses analogues activateurs ou inhibiteurs et en ce qu'il a une affinité spécifique pour le site catalytique dudit anticorps.

10 Dans une autre forme de réalisation préférée de l'invention, un composé selon l'invention est un ligand se fixant sur un récepteur et notamment une hormone, une drogue, un médicament, ou un de leurs fragments ou analogues.

15 Selon les modes de réalisation, les composés décrits ci-dessus sont capables d'augmenter l'activité catalytique d'anticorps catalytiques dégradant les drogues, hormones ou médicaments dont ils dérivent ou dont ils sont analogues.

20 Ainsi, l'invention porte également sur un composé apte à stimuler *in vivo* la dégradation de médicaments ou de drogues par des anticorps catalytiques spécifiques, caractérisé en ce qu'il est non immunogène, qu'il comprend une drogue ou un médicament ou l'un de leurs fragments ou analogues et en ce qu'il a une affinité spécifique pour le site catalytique dudit anticorps.

25 Les fragments d'un ligand entrant dans la définition d'un composé selon l'invention sont choisis parmi les fragments ayant retenu les propriétés de fixation au récepteur. Lorsque le ligand est un polypeptide, des fragments du ligand sont des peptides gardant les propriétés de fixation au récepteur.

Un analogue d'un ligand est une molécule capable de se fixer au même récepteur que le ligand. En particulier, il s'agit d'un agoniste ou d'un antagoniste du récepteur sur lequel se fixe le ligand. Un tel analogue peut être une molécule naturelle ou artificielle isolée à l'aide d'un criblage de molécules se fixant sur un récepteur. Un exemple d'un tel ligand est un fragment du $\text{TNF}\alpha$ entrant dans la définition des composés selon l'invention et capable de se fixer aux récepteurs cellulaires p55 et p75.

En particulier, un composé préféré est caractérisé en ce qu'il comprend un peptide dérivé de la cytokine $\text{TNF}\alpha$, ledit composé étant non immunogène et présentant une affinité spécifique pour le site catalytique d'un anticorps catalytique et ledit peptide contenant l'une des séquences d'acides aminés suivantes :

LNRRA, IASVY ou LFA.

Un autre exemple de composé préféré est caractérisé en ce qu'il comprend un peptide dérivé de la thyroglobuline.

Un autre exemple de composé préféré est la codéine, analogue de la cocaïne et capable de stimuler par injection répétée, la production d'anticorps catalytiques dégradant la cocaïne.

Dans une autre forme de réalisation préférée de l'invention, un composé selon l'invention est choisi parmi les antibiotiques ou leurs analogues. Par analogue d'antibiotique, il faut comprendre une molécule de structure différente de la molécule antibiotique dont elle est l'analogue mais capable de reproduire une fonction « antibiotique » similaire.

Dans une autre forme de réalisation préférée de l'invention, un composé selon l'invention est choisi parmi un peptide viral, bactérien ou parasitaire.

De tels composés sont ainsi capables de stimuler la production catalytique dégradant les protéines virales bactériennes ou parasitaires et permettent

ainsi de lutter contre les infections virales, bactériennes ou parasitaires correspondantes.

Des exemples de peptides particulièrement préférés sont les peptides non immunogènes dérivés d'épitopes de surface ou de protéines de virulence d'organismes pathogènes tels que les virus HIV, HSV ou HBV, de bactéries pathogènes telles que *Legionella*, *Listeria*, *Staphylococcus*, ou de parasites tels que *P. faciparum*, *Echinococcus*, *Leishmania* ou *Trypanosoma*.

En particulier, un exemple d'un tel composé selon l'invention est un composé caractérisé en ce qu'il comprend un peptide non immunogène dérivé d'un épitope d'un virus Herpès.

Dans une autre forme de réalisation préférée de l'invention, un composé selon l'invention est un xénobiotique récalcitrant et potentiellement toxique ou l'un de ses fragments. On entend par xénobiotique récalcitrant toute molécule étrangère à l'organisme susceptible de s'accumuler dans les tissus ou le milieu intérieur d'un homme ou d'un animal. Certaines de ces molécules, et notamment les pesticides (composés organophosphorés), la dioxine ou les organochlorés (PCB, DDT...), sont potentiellement toxiques pour l'organisme, en particulier sur le long terme.

L'accumulation dans l'organisme de certains xénobiotiques est en particulier cancérigène ou neurotoxique.

L'invention vise par conséquent un composé apte à stimuler *in vivo* l'hydrolyse de xénobiotiques potentiellement toxiques par des anticorps catalytiques spécifiques, ledit composé étant caractérisé en ce qu'il est non immunogène, qu'il comprend un xénobiotique récalcitrant et potentiellement toxique, ou l'un de ses fragments et en ce qu'il a une affinité spécifique pour le site catalytique dudit anticorps.

Elle vise également l'utilisation d'un xénobiotique récalcitrant non immunogène ou l'un de ses fragments ayant une affinité spécifique pour le site catalytique d'un anticorps pour stimuler l'hydrolyse dudit xénobiotique par lesdits anticorps catalytiques.

5 Selon encore une autre forme de réalisation de l'invention, un composé selon l'invention est un analogue d'allergène.

On entend par allergène tout produit susceptible de déclencher une réaction allergique. Un analogue d'allergène est une molécule dont la structure mime l'allergène mais n'est pas immunogène. De tels analogues
10 d'allergènes selon l'invention, en augmentant l'activité catalytique d'anticorps capables de dégrader, en particulier par hydrolyse, les allergènes et en stimulant indirectement la production d'anticorps sériques et sécrétoires, sont ainsi susceptibles de désensibiliser partiellement ou totalement un sujet allergique.

15 Par conséquent, l'invention porte également sur un composé apte à prévenir ou à diminuer une réaction allergique liée à un allergène caractérisé en ce qu'il comprend un analogue non immunogène dudit allergène et en ce qu'il a une affinité spécifique pour le site catalytique dudit anticorps.

20 Elle vise également l'utilisation d'un analogue non immunogène d'un allergène ayant une affinité spécifique pour le site catalytique d'un anticorps pour prévenir ou diminuer une réaction allergique liée audit allergène.

Toute composition pharmaceutique comprenant à titre de principe actif un quelconque composé décrit ci-dessus fait également partie de l'invention.
25 Par composition pharmaceutique, on entend toute composition apte à être administrée à l'homme ou à l'animal. Le principe actif peut être, le cas échéant, associé à une autre molécule active dont la fonction est d

moduler ou stimuler l'activité biologique du composé selon l'invention, ou encore d'en diminuer les effets secondaires éventuels.

La composition comprend en outre un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

5 Les véhicules utilisés dans la préparation des compositions pharmaceutiques sont choisis de préférence parmi ceux généralement utilisés dans les préparations vaccinales. Ils sont bien entendu choisis en fonction du mode d'administration de la composition et de son utilisation.

10 L'invention porte également sur une utilisation d'un composé selon l'invention dans la préparation d'une composition pharmaceutique pour le traitement ou la prévention d'une pathologie liée à une déficience enzymatique.

15 Elle vise aussi une utilisation d'un composé selon l'invention dans la préparation d'une composition pour la stimulation de l'hydrolyse de xénobiotiques, de drogues, de médicaments ou de toute autre molécule potentiellement toxique pour l'organisme.

Elle vise en outre une utilisation d'un composé selon l'invention dans la préparation d'une composition pour la prévention ou la désensibilisation aux réactions allergiques.

20 Les anticorps catalytiques, outre leur propriétés catalytiques, reconnaissent par leur région Fc, les récepteurs cellulaires, et en particulier les récepteurs présents sur les cellules présentatrices d'antigènes, les cellules cytotoxiques et les macrophages, et plus généralement les différentes cellules du système immunitaire. Il est donc important de souligner qu'en
25 stimulant la production d'anticorps catalytiques par les composés selon l'invention, il est possible de cibler une activité catalytique donnée au niveau d'une cellule reconnaissant l'anticorps catalytique.

Lorsqu'il s'agit d'une reconnaissance de type non spécifique, c'est-à-dire par exemple par les régions Fc des anticorps, l'activité catalytique peut être ciblée sur les cellules du système immunitaire de type cellulaire, celle-ci s'ajoutant alors à l'action sur le système humoral (synthèse des anticorps recherchés par les lymphocytes B).

Lorsqu'il s'agit d'une reconnaissance spécifique d'un épitope donné, c'est-à-dire par les régions paratopiques du Fab'₂, l'un des épitopes reconnus n'étant pas le substrat enzymatique de l'anticorps catalytique, les composés selon l'invention permettent alors de cibler l'activité catalytique sur une cible choisie, ladite cible comprenant ledit épitope. Il s'agit ici d'anticorps présentant une double-spécificité à la fois pour un épitope spécifique et pour le substrat enzymatique. Ainsi, les composés selon l'invention permettent de cibler une activité catalytique à des effecteurs du système immunitaire et/ou inflammatoire.

L'invention porte enfin sur un procédé de sélection d'un composé selon l'invention comprenant la sélection et l'isolement d'un anticorps catalytique naturel ou induit par l'injection répétée d'une molécule immunogène, caractérisé en ce qu'il comprend en outre les étapes suivantes :

- a) la synthèse et/ou l'extraction de composés dérivés d'une molécule immunogène reconnue par l'anticorps catalytique isolé ;
- b) le cas échéant, un premier criblage à l'aide d'un test biologique et/ou biochimique des composés interagissant avec le site catalytique dudit anticorps catalytique,
- c) la sélection des composés non immunogènes présentant une affinité spécifique pour le site catalytique de l'anticorps parmi les composés synthétisés ou extraits à l'étape a) ou sélectionnés à l'étape b), à l'aide d'un test permettant la mesure de ladite affinité.

De nombreuses méthodes de sélection et d'isolement d'un anticorps catalytique naturel ou induit par l'injection répétée d'une molécule immunogène ont été décrites dans l'état de la technique et peuvent être utilisées. L'homme du métier pourra en particulier se reporter aux publications scientifiques décrivant l'isolement d'anticorps catalytiques naturels ou induits et notamment : *Blackburn G.M. et Garçon A. (2000) in « Biotechnology » Vol. 8b, 2nd edition Wiley VCH pp 404-490*, ainsi qu'aux technologies d'isolement des anticorps monoclonaux connus de l'homme du métier, et en particulier la technique des cultures d'hybridomes développées par Kohler et Milstein (1975).

A l'étape (a) du procédé de l'invention, il s'agit d'obtenir des composés dérivés d'une molécule immunogène reconnue par l'anticorps catalytique sélectionné et isolé préalablement. Les composés peuvent être synthétisés en particulier par chimie combinatoire, par biosynthèse ou par bioconversion. La structure chimique des composés synthétisés en (a) peut aussi être prédite à l'aide de méthodes bio-informatiques de prédiction de structure chimique.

Dans un mode de mise en œuvre particulier, les composés sont dérivés d'un peptide immunogène et sont synthétisés par mutagenèse d'un ADN codant ledit peptide immunogène et par l'expression de l'ADN muté dans une cellule hôte selon les méthodes de biologie moléculaire connues de l'homme du métier telles que celles décrites par Sambrook *et al.* (Molecular Cloning : a laboratory manual, 3rd Ed. Cold Spring Harbor, Laboratory press, New York, 2001).

Le cas échéant, en particulier lorsque les composés susceptibles d'interagir avec le site catalytique sont mal connus, le procédé peut comporter une première étape de criblage (étape (b) du procédé) à l'aide d'un test biologique et/ou biochimique des composés interagissant avec le site catalytique dudit anticorps. Cette étape consiste, après avoir généré un

grand nombre de composés dérivés du composé immunogène, à sélectionner dans un premier temps les composés ayant gardé la propriété de se fixer à l'anticorps catalytique afin de réduire le nombre de composés à cribler à l'étape (c). Tout test permettant d'identifier parmi un ensemble
5 de composés le ou les composés interagissant spécifiquement avec un anticorps catalytique donné peut être utilisé dans le procédé de l'invention.

Dans un mode de mise en œuvre particulier du procédé, les composés synthétisés ou extraits à l'étape (b) sont des peptides et sont sélectionnés à l'aide d'un criblage biochimique de type test catELISA (Tawfik *et al.* 1993, supra), un criblage sur puce à protéines ou un criblage par mesure de la surface plasmonique de résonance.
10

Une puce à protéine est constituée d'un support sur lequel sont fixés à des positions déterminées les différents peptides à cribler. Le marquage de l'anticorps catalytique et la mise en contact avec la puce à protéine dans des conditions permettant les interactions protéines-protéines permettent la
15 sélection des peptides interagissant spécifiquement avec l'anticorps catalytique.

Les techniques de mesure de la surface plasmonique de résonance sont connues de l'homme du métier et permettent d'en déduire les constantes d'affinité entre deux molécules. De telles techniques peuvent être mises en œuvre aisément, notamment à l'aide du dispositif BIAcore (Silin V. et Plant A (1997) Trends Biotechnol. 15 : 353-359).
20

De manière générale, toute méthode biochimique permettant de tester l'interaction d'un peptide avec un anticorps, et en particulier les méthodes dérivées du Western blot, peuvent être utilisées dans le procédé de l'invention pour procéder au criblage biochimique des composés interagissant avec l'anticorps.
25

On choisira de préférence des méthodes utilisables en routine et permettant un criblage à haut débit des molécules.

On peut aussi utiliser les différents tests biologiques développés pour détecter des interactions moléculaires et en particulier les interactions entre deux peptides ou deux polypeptides.

Dans un mode de mise en œuvre préféré du procédé de l'invention, les composés peptidiques sont sélectionnés par la technique du phage display ou par la technique du double-hybride. Ces méthodes sont bien connues de l'homme du métier et sont décrites dans Sambrook *et al.* (2001, *supra*).

Parmi l'ensemble des composés synthétisés et éventuellement sélectionnés par le premier criblage, les composés selon l'invention sont ensuite sélectionnés à l'étape (c) du procédé, à l'aide d'un test permettant la mesure de l'affinité pour le site catalytique de l'anticorps.

Par exemple, un composé selon l'invention peut être sélectionné par mesure de la vitesse de la réaction catalysée par l'anticorps catalytique en présence soit du composé à tester, soit du composé immunogène de référence. Lorsque la vitesse de la réaction catalysée par l'anticorps, mesurée en présence du composé testé, est significativement supérieure à celle mesurée en présence du composé immunogène de référence, le composé testé est sélectionné.

Par conséquent, tout type de tests permettant de mesurer la constante d'affinité des complexes composés-anticorps peut être utilisé pour sélectionner les composés non immunogènes selon l'invention.

Un autre aspect de l'invention concerne des nouvelles méthodes de traitement thérapeutique.

En particulier, l'invention porte sur une méthode :

- de traitement thérapeutique ou de prévention d'une pathologie liée à une déficience enzymatique,
- de stimulation de l'hydrolyse de xénobiotiques, de drogues, de médicaments ou de toute autre molécule potentiellement toxique pour l'organisme, ou
- de prévention ou de désensibilisation aux réactions allergiques.

Dans tous les cas, les méthodes comprennent l'administration à un organisme, d'une composition pharmaceutique comprenant à titre de principe actif un composé selon l'invention, seul ou en association avec une autre substance pharmacologiquement active capable d'augmenter *in vivo* l'activité d'un anticorps catalytique, en combinaison avec un véhicule pharmaceutique approprié.

Les modes d'administration, la composition du véhicule et le dosage des composés administrés pour le traitement seront choisis en fonction de l'effet thérapeutique ou préventif recherché. Selon les cas, les formes d'administrations peuvent être locales ou systémiques et en particulier orale, sublinguale, intraveineuse, nasale, aérosol, intramusculaire, sous-cutané ou alimentaire.

On remarquera que les méthodes de traitements de l'invention s'apparenteront en général aux méthodes vaccinales, l'homme du métier pourra se reporter notamment aux véhicules classiquement utilisés dans ce domaine.

Les exemples qui suivent permettent d'illustrer certains modes de réalisation de l'invention sans être toutefois limitatifs.

LEGENDES DES FIGURES

Figure 1 : La figure 1 illustre le mécanisme d'adaptation induite (induced fit) permettant à un composé non immunogène de déplacer l'équilibre des états conformationnels d'un anticorps catalytique des formes catalytiques peu actives ou non actives vers des formes des isomères actives. Le déplacement de l'équilibre conduit *in vivo* à une augmentation de l'activité catalytique de l'anticorps catalytique et indirectement à une stimulation de sa production.

EXEMPLES

EXEMPLE 1 : Composé capable d'augmenter l'activité catalytique des IgA sécrétées dirigées contre des épitopes du virus Herpes pour lutter contre les infections au virus Herpès.

Les IgA sécrétées sont les principaux effecteurs du système immunitaire des muqueuses. Elles sont notamment impliquées dans la reconnaissance des antigènes bactériens, viraux ou des protozoaires. Il a été montré en particulier que des IgA extraites du lait maternel sain peuvent posséder des activités catalytiques de type protéine kinase, DNase ou RNase (Buneva V.N. *et al.* (1998) Appl. Biochem. Biotechnol. 75 : 63-76, Nevinsky G.A. *et al.* (1998) Appl. Biochem. Biotechnol. 75 : 77-91).

Parmi les IgA sécrétées, la production d'un anticorps catalytique dirigé contre des épitopes du virus Herpes simplex virus type 1 pourrait être stimulée par l'application cutanée de peptides non immunogènes sous formes de patches. Les peptides non immunogènes choisis représentent les séquences spécifiques des épitopes connus de l'HSV1.

Une approche similaire peut être mise en œuvre pour stimuler la production d'anticorps catalytiques hydrolysant des peptides de HSV2, responsable de l'herpes génital, ou de l'herpes Zoster, responsable du zona.

EXEMPLE 2 : Composé capable d'augmenter l'activité catalytique d'un anticorps hydrolysant certaines séquences peptidiques du $\text{TNF}\alpha$ pour le traitement de l'arthrite rhumatoïde.

Le $\text{TNF}\alpha$ (tumor necrosis factor) est une cytokine qui joue un rôle central dans les phénomènes inflammatoires rencontrés dans les maladies auto-immunes comme l'arthrite rhumatoïde ou la myocardie auto-immune. Il joue aussi un rôle en tant que régulateur d'autres cytokines pro-inflammatoires. L'action inflammatoire du $\text{TNF}\alpha$ est liée à sa fixation à deux récepteurs cellulaires, p55 et p75. Cette fixation met en jeu des boucles du $\text{TNF}\alpha$ formées par les résidus 29-34, 84-91 et 143-148.

Des peptides non immunogènes et ayant une affinité spécifique avec un anticorps catalytique capable d'hydrolyser le $\text{TNF}\alpha$ sont sélectionnés parmi des peptides contenant les séquences LNRRA (29-33), IASVY (83-87) et LFA (143-145). L'injection répétée de ces peptides chez un patient souffrant d'arthrite rhumatoïde devrait permettre de stimuler *in vivo* la production d'anticorps catalytiques hydrolysant le $\text{TNF}\alpha$ au niveau des séquences de reconnaissance des récepteurs cellulaires, réduisant ainsi les mécanismes inflammatoires liés à l'arthrite rhumatoïde.

EXEMPLE 3 : Composé capable d'augmenter l'activité catalytique d'un anticorps hydrolysant la cocaïne pour traiter les phénomènes d'accoutumance aux drogues.

La consommation de drogues chez un sujet provoque un phénomène d'accoutumance. La quantité de drogue circulant dans le sang après

administration est directement reliée à l'effet stupéfiant et à l'accoutumance qui s'en suit. L'immunisation d'un sujet à l'aide de peptides immunogènes stimulant directement la production d'anticorps catalytiques hydrolysant la cocaïne permet de diminuer, voire éliminer, la quantité de cocaïne circulante. Afin d'augmenter l'activité catalytique de ces anticorps et de stimuler indirectement leur production, il pourrait être injecté, de manière répétée, par voie intraveineuse, de faibles concentrations de codéine, un composé non immunogène proche de la cocaïne.

EXEMPLE 4 : Composé capable d'augmenter l'activité catalytique d'un anticorps à activité β -lactamase.

Le développement d'anticorps catalytiques à partir de sites actifs enzymatiques par utilisation du réseau idiotypique a été démontré (Avalle B. et al., *Faseb J* (1998) 12 :1055-1060). En particulier, à partir du site actif de la β -lactamase, il a été obtenu un anticorps (Ab1) spécifique, inhibiteur de l'activité β -lactamase (Kosnikov et al., *PNAS* (2000) 97 : 13526-13531). Cet anticorps permet la production d'une seconde génération d'anticorps Ab2, anti-idiotypiques, et porteurs d'une activité proche de celle de la β -lactamase.

Ainsi, la létalité liée à l'injection répétée de pénicilline devrait être diminuée, en stimulant la production d'anticorps anti-idiotypique à activité β -lactamase par l'administration de peptides non immunogènes mimant le paratope de l'anticorps induit en présence du site actif de la β -lactamase.

EXEMPLE 5 : Composé capable d'augmenter l'activité catalytique d'anticorps hydrolysant un allergène pour diminuer ou prévenir une réaction allergique.

Une désensibilisation spécifique induit à la fois l'augmentation des anticorps bloquants sériques et sécrétoires, la diminution de la production

d'IgE spécifiques et la modification de la réponse des mastocytes, des basophiles ainsi que des lymphocytes.

L'administration à un sujet sensible d'un allergène d'une molécule non immunogène dérivée de l'allergène devrait permettre de modifier la réponse immunologique vers l'augmentation de la production d'anticorps catalytiques dirigés contre cet allergène, une augmentation indirecte de la production d'anticorps bloquant sériques et sécrétoires et la diminution de la production d'IgE spécifiques, compte tenu de l'hydrolyse de l'allergène. L'ensemble de ces réponses permet de diminuer ou de prévenir la réaction allergique.

Les trois exemples ci-après illustrent cette application :

A. *Peptides non immunogènes pour prévenir ou diminuer les allergies aux médicaments anti-infectieux.*

Les antibiotiques sont les molécules les plus souvent incriminées dans les réactions d'allergies aux médicaments anti-infectieux (50% des cas). On sait notamment que l'allergénicité est dans la grande majorité des cas portée par le cycle β -lactame. En étant clivé au cours du métabolisme, le cycle β -lactame donne l'haptène pénicilloyl qui est capable d'induire la production d'IgE.

Il serait donc possible à l'aide de peptides non immunogènes inhibiteurs de l'activité β -lactamase, injectés sous forme orale, d'induire la production d'anticorps non IgE capables d'hydrolyser les antibiotiques à noyau β -lactame, empêchant alors la production d'anticorps IgE.

B. *Peptides non immunogènes stimulant la production d'anticorps catalytique hydrolysant la sérotonine pour prévenir ou diminuer les allergies alimentaires.*

Depuis plusieurs années, on assiste à une augmentation alarmante des allergies alimentaires. Ce phénomène est apparu de façon concomitante avec une modification de nos habitudes alimentaires : on assiste à une augmentation importante de la quantité de certains médiateurs histaminolibérateurs dans divers aliments frais : l'histamine, la sérotonine, la tyramine etc... Ces produits peuvent circuler dans le sang, d'autant plus facilement que la paroi intestinale est immature (cas du jeune enfant) et induire des phénomènes d'allergie par médiation cellulaire. La sérotonine (5-hydroxytryptamine) par exemple est dérivée du tryptophane et dégradée en 5-hydroxyindole acétique.

Il serait donc possible de sélectionner des peptides non immunogènes dérivés de la sérotonine et ayant une affinité spécifique pour un anticorps catalytique hydrolysant la sérotonine. L'injection par voie orale de tels peptides stimulant la production d'anticorps catalytique dégradant l'excès de sérotonine devrait permettre de réduire les phénomènes allergiques liés à l'alimentation.

C. *Peptides non immunogènes stimulant la production d'anticorps catalytiques hydrolysant les protéines d'arachide.*

L'allergie à l'arachide affecte un nombre de plus en plus important d'individus. La gravité des chocs auxquels elle donne lieu ainsi que sa fréquence sont en augmentation. Parmi les nombreux allergènes détectés sinon caractérisés, une protéine de 17 kD, l'Ara h II a été identifiée comme allergène majeur et caractérisé. Des comparaisons de séquences ont permis d'identifier des homologues de séquences avec des protéines de

différents aliments de la famille des légumineuses qui pourraient provoquer des sensibilisations croisées.

5 L'absorption par voie orale de tels peptides non immunogènes stimulant la production d'anticorps catalytiques dégradant les protéines des légumineuses responsables de ces allergies devrait permettre de réduire ces phénomènes allergiques.

REVENDICATIONS

1. Composé capable de moduler l'activité d'un anticorps catalytique, ledit composé étant caractérisé en ce qu'il a une affinité spécifique pour le site catalytique dudit anticorps, et en ce qu'il n'est pas immunogène.
2. Composé selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il est capable de stimuler la production dudit anticorps catalytique.
3. Composé selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce qu'il est choisi dans un groupe comprenant :
 - un substrat d'une enzyme ou l'un de ses analogues, inhibiteur ou activateur ;
 - un ligand se fixant sur un récepteur et notamment une hormone, une drogue, un médicament ou l'un des ses fragments ou analogues ;
 - un antibiotique ou l'un de ses analogues ;
 - un peptide viral, bactérien ou parasitaire ;
 - un xénobiotique récalcitrant et potentiellement toxique ou l'un de ses fragments; ou,
 - un analogue d'allergène.
4. Composé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend un peptide non immunogène dérivé d'un épitope du virus Herpès.
5. Composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 caractérisé en ce qu'il comprend un peptide dérivé de la cytokine

TNF α , ledit peptide contenant l'une des séquences d'acides aminés suivantes :

LNRRA, IASVY ou LFA.

- 5 6. Composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 caractérisé en ce qu'il comprend un peptide dérivé de la thyroglobuline.
7. Composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un peptide ayant une affinité pour le site-actif de la β -lactamase.
- 10 8. Composé selon la revendication 7 caractérisé en ce qu'il inhibe spécifiquement l'activité β -lactamase.
- 15 9. Composé apte à augmenter *in vivo* le niveau physiologique d'une activité enzymatique, caractérisé en ce qu'il comprend un substrat non immunogène d'un anticorps catalytique ayant ladite activité enzymatique ou l'un de ses analogues activateurs ou inhibiteurs et en ce qu'il a une affinité spécifique pour le site catalytique dudit anticorps.
- 20 10. Composé apte à stimuler *in vivo* l'hydrolyse de xénobiotiques potentiellement toxiques par des anticorps catalytiques spécifiques, caractérisé en ce qu'il est non immunogène, qu'il comprend un xénobiotique récalcitrant et potentiellement toxique ou l'un de ses fragments et en ce qu'il a une affinité spécifique pour le site catalytique dudit anticorps.
- 25 11. Composé apte à stimuler *in vivo* la dégradation de médicaments ou de drogues par des anticorps catalytiques spécifiques, caractérisé

en ce qu'il est non immunogène, qu'il comprend un médicament ou une drogue ou l'un de leurs fragments ou analogues et en ce qu'il a une affinité spécifique pour le site catalytique dudit anticorps.

5 12. Composé pour prévenir ou diminuer une réaction allergique liée à un allergène, caractérisé en ce qu'il comprend un analogue non immunogène dudit allergène et en ce qu'il a une affinité spécifique pour le site catalytique dudit anticorps.

10 13. Utilisation d'un composé selon l'une des revendications 1 à 3 à la préparation d'une composition pharmaceutique pour le traitement ou la prévention d'une pathologie liée à une déficience enzymatique.

14. Utilisation d'un composé selon l'une des revendications 1 à 3 à la préparation d'une composition pharmaceutique pour la stimulation de l'hydrolyse de xénobiotiques, de drogues, de médicaments ou de toute autre molécule potentiellement toxique pour l'organisme.

15 15. Utilisation d'un composé selon l'une des revendications 1 à 3 à la préparation d'une composition pharmaceutique pour la prévention ou la désensibilisation aux réactions allergiques.

20 16. Procédé de sélection d'un composé selon l'une des revendications 1 à 3, comprenant la sélection et l'isolement d'un anticorps catalytique naturel ou induit par l'injection répétée d'une molécule immunogène, caractérisé en ce qu'il comprend en outre les étapes suivantes :

a) la synthèse et/ou l'extraction de composés dérivés d'une molécule immunogène reconnue par l'anticorps catalytique isolé ;

25 b) le cas échéant, un premier criblage à l'aide d'un test biologique et/ou biochimique des composés interagissant avec le site catalytique dudit anticorps catalytique,

c) la sélection des composés non immunogènes présentant une affinité spécifique pour le site catalytique de l'anticorps parmi les composés synthétisés ou extraits à l'étape a) ou sélectionnés à l'étape b), à l'aide d'un test permettant la mesure de ladite affinité.

17. Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que les composés dérivés d'une molécule immunogène sont synthétisés par chimie combinatoire, par biosynthèse ou par bioconversion.

18. Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que les composés sont dérivés d'un peptide immunogène et sont synthétisés par mutagenèse d'un ADN codant pour ledit peptide immunogène et par l'expression de l'ADN muté dans une cellule hôte.

19. Procédé selon l'une des revendications 16 à 18, caractérisé en ce que les composés synthétisés ou extraits d'une molécule immunogène sont des peptides et sont sélectionnés à l'aide d'un premier criblage de types test catELISA, criblage sur puce à protéines ou criblage par mesure de la surface plasmonique de résonance (BIAcore).

20. Procédé selon l'une des revendications 16 à 18, caractérisé en ce que les composés synthétisés ou extraits d'une molécule immunogène sont des peptides et sont sélectionnés à l'aide d'un premier criblage de type phage display ou double-hybride.

21. Procédé selon l'une des revendications 16 à 18, caractérisé en ce qu'un composé non immunogène est sélectionné à l'étape (c) par mesure de la vitesse de la réaction catalysé par l'anticorps catalytique en présence soit du composé à tester, soit du composé immunogène dont le composé à tester dérive et sélection du

composé en présence duquel la vitesse de la réaction est significativement supérieure à celle mesurée en présence du composé immunogène dont il dérive.

- 5 22. Composition pharmaceutique comprenant à titre de principe actif un composé selon l'une des revendications 1 à 12 en combinaison avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.
- 10 23. Composition pharmaceutique selon la revendication 22, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre une autre molécule active dont la fonction est de moduler ou stimuler l'activité biologique dudit composé, ou d'en diminuer les effets secondaires éventuels.